Lehrstuhl für experimentelle Zahnheilkunde

(Vorstand: Prof. Dr. G. Siebert)

an der Klinik und Poliklinik für

Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten

der Universität Würzburg

(Direktor: Prof. Dr. R. Naujoks)

DIE SYNTHESE EXTRAZELLULÄRER POLYSACCHARIDE DURCH STREPTOCOCCUS MUTANS DER SEROTYPEN b UND e IN VITRO

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hermann Rieder

aus Eichstätt

Würzburg, den 3. Juli 1981

1982

Lehrstuhl für experimentelle Zahnheilkunde

(Vorstand: Prof. Dr. G. Siebert)

an der Klinik und Poliklinik für

Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten

der Universität Würzburg

(Direktor: Prof. Dr. R. Naujoks)

DIE SYNTHESE EXTRAZELLULÄRER POLYSACCHARIDE DURCH STREPTOCOCCUS MUTANS DER SEROTYPEN b UND e IN VITRO

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hermann Rieder

aus Eichstätt

Würzburg, den 3. Juli 1981

Referent: Prof. Dr. F. Gehring

Korreferent: Prof. Dr. R. Naujoks

Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN

INHALT

Einleitung	1
Material und Methoden	4
Ergebnisse	7
Diskussion	12
Zusammenfassung	19
Schrifttum	20

EINLEITUNG

Die Unzulänglichkeit symptomatischer Behandlung kariöser Zähne durch Applizieren von Füllungen hat die Bestrebungen verstärkt, mit Hilfe wirksamer Prophylaxemaßnahmen eine kausale Therapie anzubieten und damit eine möglichst vollständige Kariesfreiheit zu erreichen. Über die Grundzüge der Ätiologie dieser Krankheit hat bereits 1889 W. D. Miller berichtet. Er beschreibt die Karies als chemisch-parasitären Prozeß, bei dem Kohlenhydrate der Nahrung von Mikroorganismen zu Säuren vergoren werden. Diese Säuren demineralisieren den Schmelz der Zahnoberfläche und führen so zur Erweichung und Auflösung der Zahnhartsubstanz. Eine Reihe von Autoren hat diese Vorstellung seitdem variiert und ergänzt, der Kern von Millers Aussage hat jedoch bis heute Gültigkeit.

In diesen Vorgang des fermentativen Kohlenhydratabbaus an der Zahnoberfläche durch bestimmte Bakterienarten muß eine kausale Behandlung eingreifen um den Kariesprozeß aufzuhalten. An welcher Stelle die Kausalkette dabei unterbrochen wird, ist primär nebensächlich. Die Entfernung der Plaque von der Zahnoberfläche durch Mundhygienemaßnahmen erfordert Einsicht, Umorientierung und Mitarbeit der Gesamtbevölkerung. Gleiches gilt auch für bestimmte Formen der Anwendung von Fluorid zur Kariesprophylaxe. Die demineralisierende Säure könnte zwar durch Lacke und Versiegler von der Zahnhartsubstanz ferngehalten werden, doch ist diese Maßnahme für eine generelle Anwendung im Augenblick noch zu arbeitsaufwendig und damit zu teuer. Außerdem bleibt der Schutz, besonders durch die morphologische Situation im Approximalbereich der Zähne, bisher unvollständig. Eine Einschränkung der Substratzufuhr für die Mikroorganismen wäre bei teilweisem Ersatz der Saccharose durch Zuckeraustauschstoffe zu erreichen. Wünschenswerter wäre allerdings eine Wandlung der Ernährungsgewohnheiten im Sinne einer Einschränkung und Steuerung des Süßwaren-

konsums. Auch durch Beeinflussung der Mikroorganismen oder durch Eingriff in deren Stoffwechselaktivitäten ließe sich die Karies bekämpfen.

Eine besondere Schwierigkeit für eine Kariesprophylaxe, die durch Hemmung der Bakterienvermehrung oder durch Beeinflussung der Bakterienstoffwechselprodukte wirken möchte, ergibt sich aus der Vielzahl der beteiligten Bakterienarten und -stämme. Nach heutiger Auffassung stellen die Streptokokken mit S. sanguis und S. mutans die wichtigsten Vertreter. Ihre besondere Stellung beruht unter anderem auf der Fähikeit, aus Saccharose extrazelluläre Polysaccharide zu synthetisieren (Guggenheim 1974). Diese extrazellulären Polysaccharide fördern die Haftung der Bakterien auf der Zahnoberfläche und den Zusammenhalt der Kolonien. Sie stellen somit einen wichtigen Teilmechanismus bei der Plaqueausbildung dar und sind mitverantwortlich an der Kariesentstehung.

Es fehlt nicht an Versuchen,im Sinne einer Kariesprophylaxe die Polysaccharidmatrix der Plaque in vivo enzymatisch abzubauen und so die Haftung der Beläge aufzuheben. In Tierversuchen konnte die Plaquebildung unter bestimmten Bedingungen mit Dextranasen reduziert bzw. bereits gebildete Plaque zum Teil wieder aufgelöst werden. Gleichzeitig wurde eine entsprechende Kariesreduktion beobachtet (Fitzgerald et al. 1968; Block et al. 1969; Bowen 1971; Hamada et al. 1976a u. 1976b; Poulsen et al. 1978). Sehr widersprüchliche Ergebnisse brachten Anwendungen von Dextranasen im klinischen Versuch und Untersuchungen, bei denen Versuchstiere mit einer natürlichen Mundhöhlenflora verwendet wurden (Guggenheim et al. 1969 u. 1972; Caldwell et al. 1971; Nyman et al. 1972; Lobene 1971; Keyes et al. 1971; Murayama et al. 1973; Duany et al. 1975). Neben Dextranasen, die α-1,6 Bindungen spalten, wurden auch Enzyme und Enzymkombinationen untersucht, die andere Bindungstypen, insbesondere α-1,3 Bindungen spalten können. Auch diese Versuche brachten keine eindeutig positiven Ergeb-

nisse (Guggenheim et al. 1972; Frank et al. 1973; Regolati und Guggenheim 1974; Guggenheim et al. 1975; Kelstrup et al. 1973 u. 1978). Der enzymatische Abbau extrazellulärer Polysaccharide in der Mundhöhle ist demnach bisher nur unvollkommen gelungen. Die Ursache dafür dürfte auch mit darin liegen, daß die Struktur der von den verschiedenen Bakterienarten synthetisierten extrazellulären Polysaccharide noch zu wenig bekannt ist, um mit einem oder wenigen Enzymen eine Auflösung der Plaque und damit eine wirkungsvolle Kariesprophylaxe erreichen zu können.

Bratthall (1970) konnte zeigen, daß die aus der Mundhöhle isolierten Stämme von S. mutans fünf serologisch unterschiedlichen Typen zugeordnet werden können. Diese fünf Serotypen zeigen in ihrem Vorkommen große Unterschiede. Während Stämme des Typs c in Europa, Japan und Amerika häufig zu finden sind, treten die übrigen Typen seltener auf. Die Stämme der Serotypen a und b können meist überhaupt nicht nachgewiesen werden (Hamada et al. 1980). Stämme des Typs d kommen besonders häufig zusammen mit aktiver Karies in der Mundhöhle vor (Huis in't Veld et al. 1979). Neben diesen Abweichungen im Vorkommen berichten Untersuchungen von Perch et al. (1974), Linzer et al. (1976) und Jacono et al. (1975) über Unterschiede in biochemischen und serologischen Eigenschaften der S. mutans Stämme.

Da die Stämme der verschiedenen Typen von S. mutans nicht als homogene Gruppe angesehen werden dürfen, ist es notwendig, auch Art und Menge des von den einzelnen Typen synthetisierten Polysaccharids zu untersuchen um mögliche Unterschiede zu erkennen und Korrelationen zum Auftreten und zur kariogenen Wirkung erklären zu helfen. Bisherige Arbeiten über die Polysaccharidsynthese von S. mutans wurden häufig in vitro mit Glucosyltransferasen durchgeführt, die aus Kulturüberständen isoliert worden waren. Das solcherweise gewonnene EPS entspricht aber nicht dem EPS, wie es in einer Bakterienkultur und in vivo synthetisiert wird. Hierbei können mehrere Glucosyltransferasen mit unter-

schiedlichen Syntheseprodukten auftreten (Guggenheim and Newbrun 1969). Außerdem werden von den meisten S. mutans Stämmen Glucan abbauende Enzyme synthetisiert (Guggenheim and Burckhardt 1974; Dewar and Walker 1975; Pulkownik and Walker 1977), deren Aktivitäten bei verschiedenen Typen von S. mutans unterschiedlich sind (Felgenhauer und Trautner 1980). Das endgültig synthetisierte EPS wird durch antagonistische Wechselwirkung der auf- und abbauenden Enzyme entscheidend beeinflußt. Um Polysaccharid zu erhalten, das dem in vivo gebildeten vergleichbar ist, wurde in den hier beschriebenen Untersuchungen EPS verarbeitet, das aus Bakterienkulturen gewonnen wurde. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde eine große Anzahl von Stämmen identisch angezogen.

MATERIAL UND METHODEN

Die meisten der verwendeten 20 Stämme von S. mutans wurden von Prof. Gehring (Universität Würzburg; Lehrstuhl für experimentelle Zahnheilkunde) aus der menschlichen Mundhöhle isoliert und mit Hilfe des biochemischen Schemas von Shklair und Keene (1974) in Biotypen eingeteilt, die den fünf Serotypen von Bratthall (1970) entsprechen. Als Nährmedium fand 360 ml Phenol-red-broth-base-Lösung (DIFCO) und 40 ml 50 %ige Saccharoselösung (wt/vol) Verwendung. Die Phenol-red-broth-base-Lösung wurde für 40 Minuten bei 120°C im Autoklaven sterilisiert. Die Saccharoselösung wurde entweder durch fraktionierte Sterilisation[1)] oder durch sterile Filtration (Fa. Sartorius) keimfrei gemacht. Nach Einfüllen der Nährlösung wurden die Kulturflaschen für 24 Std. bei 37°C gehalten. Ausbleibender Farbumschlag des Indikators (rot-gelb) bewies, daß in der Kul-

1) Drei Tage jeweils vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert; anschließend 20 Min. bei 100°C im Wasserdampf. Zwischenzeitliche Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C.

turflasche keine Säurebildung erfolgte, die Nährlösung also keimfrei war. Beimpft wurde mit 7,5 ml einer 24 Std. alten Thioglycollate-Bouillon (DIFCO) -Vorkultur. Die Bakterienkulturen wurden für sieben Tage bei 37°C im Brutschrank gehalten. Die von den Bakterien gebildete Säure wurde alle 24 Std. mit 2,5 N autoklavierter NaOH bis zum Umschlagspunkt des Indikators neutralisiert. Zur Reinheitskontrolle wurde am fünften Tag der Bebrütung mit der Platinöse eine Probe entnommen und auf Phenol-red-agar-base-Platten (DIFCO) ausgestrichen. Nach Bebrüten im Anaerobiertopf (BBL-Gas-Pak Anaerobic-System) für 48 Std. bei 37°C wurde die Kultur unter dem Stereomikroskop auf ihre Reinheit untersucht. Als Kriterium diente dabei die charakteristische Kolonieform dieser Streptokokken.

Zur Gewinnung der Polysaccharide wurde der Flascheninhalt, nach letztmaliger Neutralisation,am siebten Tag abzentrifugiert (20 Min.; 9000 Upm; 4°C). Das Sediment wurde dreimal mit aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde dieser Teil gefriergetrocknet und als unlösliche Fraktion bezeichnet.

Der Überstand wurde mit dem dreifachen Volumen Äthanol versetzt, 48 Std. bei 4°C stehengelassen und das Ausgefällte abzentrifugiert (10 Min.; 9000 Upm; 4°C). Der Niederschlag wurde drei Tage gegen aqua dest. dialysiert, im Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend gefriergetrocknet. Dieser Teil wurde als lösliche Fraktion bezeichnet. Zur Verhinderung weiteren Bakterienwachstums während der Verarbeitungszeit wurden sämtliche Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt.

Zur Bestimmung des Kohlenhydratgehalts und der Zusammensetzung der Proben wurde das gewonnene Substrat durch Säurehydrolyse verschiedener Zeitdauer aufgeschlossen: 40 Min. mit 0,033 N H_2SO_4 zur Bestimmung des Fruktoseanteils. 6 Std., 12 Std., 18 Std. und 24 Std. mit 0,66 N H_2SO_4 zur Bestimmung des Glukoseanteils. Für diese Zeiten wurden

die Proben in verschlossenen Röhrchen bei 100°C im Ölbad inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Leerwert für 40 Min. und für 24 Std. mit aqua dest. in gleicher Weise behandelt.

Der Gesamtkohlenhydratgehalt der Proben wurde im Autoanalyzer (Technicon) nach der Anthron-Methode (Scott und Melvin 1953) bestimmt. Als Reagenz fand 0,1 %iges Anthron in konzentrierter H_2SO_4 Anwendung. 6,5 Volumenanteile Reagenz und 1 Volumenanteil der Probenlösung wurden für 17 Min. bei 95°C inkubiert und die Extinktion im Durchfluß-photometer bei 620 nm gemessen. Der Kohlenhydratgehalt der Proben wurde mit Hilfe eines mitgemessenen Glukose-standardwertes ermittelt.

Die Glukose- und Fruktosebestimmung erfolgte enzymatisch nach der Hexokinasemethode (Klotzsch und Bergmeyer 1962). Enzyme, Coenzyme und Puffersubstanzen stammten von der Firma Boehringer, Mannheim.

Zur Bestimmung der Bakterienmenge wurde der DNA Gehalt der Proben ermittelt. Nach 30 Min. Extraktion mit 0,5 N $HClO_4$ bei 70°C wurden die Proben mit Diphenylreagenz versetzt und die Extinktion bei 600 nm photometrisch gemessen. Der DNA Gehalt wurde an Hand einer Eichkurve bestimmt. Durch Anzucht auf Glukose-Nährmedium wurde der Kohlenhydratgehalt der Bakterienzellen festgestellt und in Beziehung zur DNA Menge gesetzt. Der auf diese Weise bestimmte Anteil an Bakterienzellkohlenhydrat wurde vom gefundenen Gesamtkohlenhydratgehalt der Proben abgezogen und der ermittelte Rest als EPS bezeichnet.

Zur Standardisierung der Gewichtsangaben wurde das gefriergetrocknete Substrat bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Wassergehalt ermittelt. Alle Angaben beziehen sich auf die wasserfreie Substanz. Unterschiede wurden auf Signifikanz mit dem t-Test nach STUDENT geprüft.

ERGEBNISSE

1. Anzucht

Der Laugenverbrauch bei der Neutralisation entspricht der Säuremenge, die von den Bakterien während 24 Std. synthetisiert worden war. Bei den Stämmen der Typen b und e wurden nach den ersten 24 Std. durchschnittlich 3 ml 2,5 N NaOH zur Neutralisation verbraucht. Diese Menge stieg am dritten, vierten Tag auf ca. 5 ml und ging bis zum siebten Tag wieder auf ca. 3 ml zurück (Abb. 1).

Bei allen Stämmen trat vom ersten Tag an eine flockige weiß-gelbliche bis gräuliche Trübung auf, die bis zum siebten Tag zunehmend dichter wurde. Gleichzeitig zeigte sich zunehmender Bewuchs am Boden und an den Wänden der Kulturflaschen. Das Ausleeren der Flaschen nach Ende der Anzucht war sehr mühsam, da sich dieser Niederschlag als außerordentlich klebrig erwies.

2. Polysaccharidsynthese

Die S. mutans Stämme der Typen b und e zeigen hinsichtlich der von ihnen synthetisierten Gesamtmenge an EPS keine Differenzen. Jeweils ca. 30 % des Gesamt-EPS findet sich in der unlöslichen Fraktion. Auch bezogen auf die Bakterienmasse besteht zwischen den Stämmen beider Typen kein Unterschied in der Menge an synthetisiertem EPS (Tab. I).

3. Analysenergebnisse

Der EPS-Anteil liegt bei den Stämmen beider Typen in der löslichen Fraktion bei 90 %, in der unlöslichen Fraktion bei 60 % des Probengewichts[1]. Die überwiegende Menge des EPS besteht aus Glukose. Ihr Anteil am EPS liegt in der löslichen Fraktion jeweils bei 90 %, in der unlöslichen

---

1) Probengewicht jeweils berechnet als wasserfreie Substanz (= Trockengewicht) gleich 100 %.

Fraktion bei 80 %. Der Fruktoseanteil am EPS beträgt für die Stämme des Typs b je 9 % in der löslichen und in der unlöslichen Fraktion, für die Stämme des Typs e 5 % in der löslichen und 11 % in der unlöslichen Fraktion. Die Summe von EPS und Bakterien liegt zwischen 90 und 110 % des Probengewichts (Tab. II). Bezogen auf die Bakterienmasse synthetisierten die Stämme beider Typen gleiche Mengen an löslichem und unlöslichem Glucan (Tab. III).

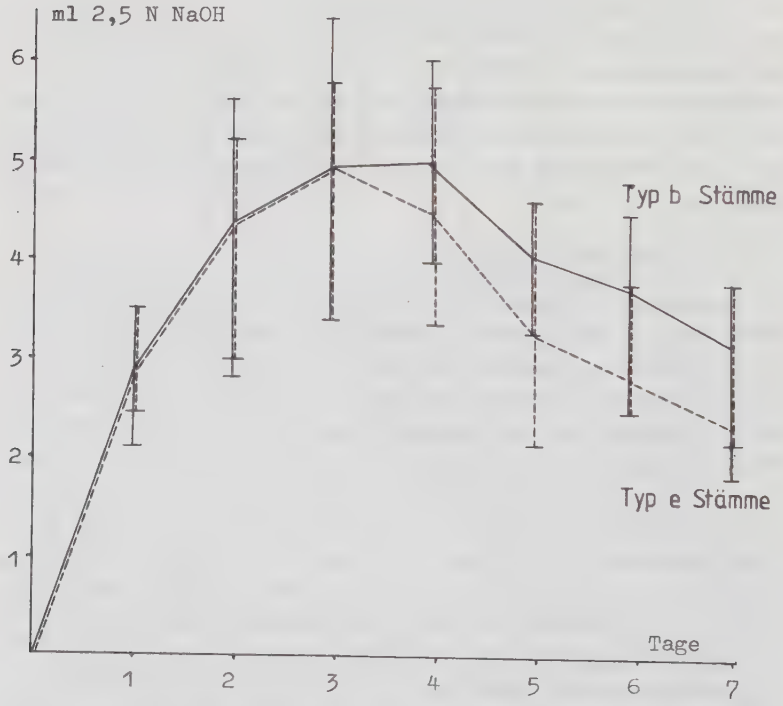

Abb. 1: Laugenverbrauch bei der täglichen Neutralisation der synthetisierten Säure.

höchster
mittlerer } Wert
niedrigster

TYP	EPS Gesamt	EPS Löslich	EPS Unlöslich	EPS Unlöslich
	g pro Liter Kulturmedium			% vom Gesamt EPS
b	6,40±1,66	4,93±1,82	1,47±0,84	23,87±13,94
e	5,33±1,52	3,63±1,84	1,70±0,92	33,92±16,52

TYP	EPS Gesamt	EPS Löslich	EPS Unlöslich
	g pro Gramm Bakterienmasse		
b	5,64±1,52	4,30±1,56	1,34±0,82
e	5,02±1,29	3,26±1,53	1,57±0,69

TYP	Bakterien	EPS + Bakterien
	g Bakterien pro Liter Kulturmedium	% der Trockenmasse
b	1,19±0,32	99,94± 5,93
e	1,02±0,12	98,17± 6,35

Tab. I Menge und Zusammensetzung des synthetisierten EPS
(Alle Angaben bezogen auf die wasserfreie Substanz; Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert)

LÖSLICHE FRAKTION

TYP	% EPS[1)]	% Glukose[2)]	% Fruktose[2)]
b	94,20± 6,64	88,25±10,84	9,21± 8,97
e	87,89± 8,92	92,57± 5,08	4,57± 2,32

TYP	% Bakterien[1)]	% EPS + Bakterien[1)]
b	8,58± 3,66	102,78± 6,74
e	12,43± 3,64	100,32± 8,08

UNLÖSLICHE FRAKTION

TYP	% EPS[1)]	% Glukose[2)]	% Fruktose[2)]
b	57,04±15,53	80,55± 8,60	8,78± 4,03
e	67,48± 5,62	81,57±10,05	11,32± 6,75

TYP	% Bakterien[1)]	% EPS + Bakterien[1)]
b	39,56±23,49	96,40± 9,67
e	28,04± 9,88	95,52± 5,88

Tab. II Analysenergebnisse der beiden Fraktionen (Angegeben jeweils Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert)
1) bezogen auf die Trockenmasse = 100 %
2) bezogen auf EPS = 100 %

TYP	Glucan Gesamt	Glucan Löslich	Glucan Unlöslich
	g pro Liter Kulturmedium		
b	5,89±1,70	4,51±1,72	1,38±0,76
e	4,98±1,56	3,43±1,85	1,55±0,76

TYP	Glucan Unlöslich
	% vom Gesamtglucan
b	23,91±13,74
e	33,69±15,62

TYP	Glucan Gesamt	Glucan Löslich	Glucan Unlöslich
	g pro Gramm Bakterienmasse		
b	5,24±1,66	3,99±1,59	1,26±0,76
e	4,70±1,38	3,27±1,74	1,44±0,57

Tab. III Anteil an Glucan
(Alle Angaben bezogen auf die wasserfreie Substanz; Mittelwert ± Standardabweichung)

DISKUSSION

Die Bedingungen während der Anzucht können nicht als rein anaerob gelten, da die Kulturflaschen täglich zur Neutralisation geöffnet wurden. Diese Milieuschwankungen sollten bei S. mutans, als fakultativ anaerober Bakterienart, keinen nennenswerten Einfluß auf Wachstum und Stoffwechselaktivität haben, zumal in vivo in der Plaque ebenfalls wechselnde Bedingungen vorliegen dürften.

Die bei der Neutralisation verbrauchte Lauge gibt Aufschluß über die Säuremenge, die von den Bakterien in 24 Stunden synthetisiert wurde. Bei den Stämmen der Typen b und e waren nach 24 Stunden durchschnittlich 3 ml 2,5 N Natronlauge zur Neutralisation nötig. Diese Menge erhöhte sich bis zum dritten, vierten Tag auf ca. 5 ml, um dann bis zum siebten Tag wieder auf ungefähr 3 ml abzusinken. Ursächlich für den Rückgang der Säureproduktion könnte entweder die Erschöpfung der Nährstoffe sein oder aber die Anhäufung von Stoffwechselprodukten, die die Bakterienaktivität hemmen. Eine Verschiebung des pH Werts in einen für die Bakterienaktivität ungünstigeren Bereich scheidet als Ursache aus, da die tägliche Neutralisation jeweils wieder Ausgangsbedingungen schuf.

Da bei der Gewinnung der beiden Fraktionen die Bakterienzellen nicht abgetrennt wurden, befinden sie sich noch in der löslichen und besonders in der unlöslichen Fraktion. Die Zuverlässigkeit des angewandten Verfahrens zur Bestimmung der EPS Menge läßt sich daraus ableiten, daß die Summe von EPS und Bakterien zwischen 90 und 100 % des Probengewichts[1)] liegt. Die Proben können somit, außer den berücksichtigten Bakterienzellen, keine weiteren wesentlichen Verunreinigungen enthalten.

Eine zusätzliche Reinigung der Fraktionen wurde nicht

---

1) Probengewicht jeweils berechnet als wasserfreie Substanz (= Trockengewicht) gleich 100 %.

vorgenommen, um den Verlust bestimmter Anteile zu vermeiden. Derartige Verluste können durch wiederholtes Fällen und Lösen, einer gängigen Reinigungsmethode für Polysaccharide, verursacht werden (Bramstedt und Trautner 1971). Durch ein Abtrennen der Bakterienzellen würden solche Polysaccharide mit entfernt, die an zellgebundene Glucosyltransferasen geknüpft sind (Trautner et al. 1978).

Die untersuchten Stämme der Typen b und e zeigen keine Unterschiede in der täglichen Säureproduktion (Abb. 1). Die pro Liter Kulturmedium synthetisierte Menge an extrazellulärem Polysaccharid ist bei den Stämmen beider Typen gleich. Das unlösliche EPS macht jeweils ca. 30 % vom Gesamt-EPS aus. Keinen Unterschied ergibt auch die Gegenüberstellung der pro Gramm Bakterienmasse synthetisierten EPS-Mengen (Tab. I). Ebenso herrscht zwischen den Stämmen beider Typen Übereinstimmung in der jeweiligen Zusammensetzung von löslicher und unlöslicher Fraktion (Tab. II und III).

Unterschiede in Art und Menge des synthetisierten EPS zeigt dagegen ein Vergleich mit Stämmen der anderen Typen von S. mutans. Die Polysaccharide von Stämmen der Typen c und d, die von Trautner et al. (1978 und 1981a) untersucht wurden, weisen sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion einen wesentlich geringeren Anteil an Fruktose auf. Da die Anzucht bei allen Stämmen identisch durchgeführt wurde, kann das gehäufte Auftreten von Fruktosepolymeren bei den Stämmen der Typen b und e nur auf eine typenspezifische stärkere Synthese von Fruktanen zurückgeführt werden. Kariesätiologische Bedeutung kommt solchen Fruktanen, neben wasserlöslichen Glucanen, in ihrer Eigenschaft als Reservekohlenhydrate zu. Sie ermöglichen es den Mikroorganismen auch in Substratmangelzeiten den Säureangriff auf die Zahnhartsubstanzen fortzusetzen (Hotz et al. 1972).

Die weitere Gegenüberstellung mit den Arbeiten von Trautner et al. zeigt, daß, bezogen auf die Bakterienmasse, von allen untersuchten Stämmen diejenigen des Typs d die

größte Menge an extrazellulären Polysacchariden synthetisierten (Abb. 2). Ebenfalls auf die Bakterienmasse bezogen enthält die wasserunlösliche Fraktion bei den Stämmen des Typs d mehr als doppelt soviel EPS als bei den übrigen Stämmen (Abb. 3). Die pro Liter Kulturmedium synthetisierte EPS-Menge liegt bei den Stämmen des Typs d niedriger, da die Bakterienmasse pro Liter Medium geringer ist. Im Hinblick auf die Glucansynthese ergibt sich ein ganz ähnliches Bild. Die Stämme des Typs d bilden, bezogen auf die Bakterienmasse, fast doppelt soviel Glucan als die Stämme der Typen b, c und e (Abb. 4). Die Stämme des Typs d weisen mit rund 44 % auch den höchsten prozentualen Anteil unlöslichen Glucans am Gesamtglucan auf, wobei in dieser Beziehung die Stämme des Typs e mit rund 34 % noch am nächsten liegen (Abb. 5). Hinsichtlich der Menge und der Zusammensetzung des extrazellulären Polysaccharids lassen sich die Typen von S. mutans in Gruppen einteilen. Die Stämme des Typs d heben sich mit ihrer, bezogen auf die Bakterienmasse, großen Menge an synthetisiertem EPS und dem hohen Prozentsatz unlöslichen Glucans von den übrigen Stämmen ab. Die Stämme der Typen b, c und e synthetisieren, abgesehen von dem hohen Fructananteil bei den Stämmen der Typen b und e, ihrerseits ein in Art und Menge ähnliches Polysaccharid. Die Stämme des Typs a können hinsichtlich des von ihnen synthetisierten Polysaccharids weder der einen noch der anderen Gruppe eindeutig zugeordnet werden.

Da alle Stämme unter identischen Bedingungen inkubiert waren, kommen als Ursache für das unterschiedliche Syntheseverhalten nicht wechselnde Milieueinflüsse bei der Anzucht, sondern nur Typ-spezifische Eigenschaften in Frage. Kuramitsu (1975) und Ciardi et al. (1977) konnten von Bakterienkulturen, die Glucan verschiedener Löslichkeit synthetisierten, mindestens zwei unterschiedliche Glucosyltransferasen isolieren. Felgenhauer (1976) berichtet von Glucosyltransferasen verschiedener Aktivität, die er von Kul-

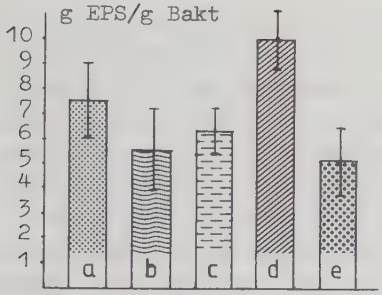

Abb. 2 g Gesamt-EPS pro g Bakterienmasse bei den Stämmen der Typen a-e von S.mutans

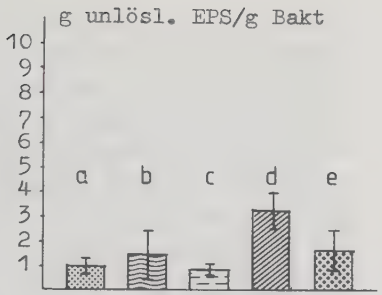

Abb. 3 g unlösliches EPS pro g Bakterienmasse bei den Stämmen der Typen a-e von S. mutans

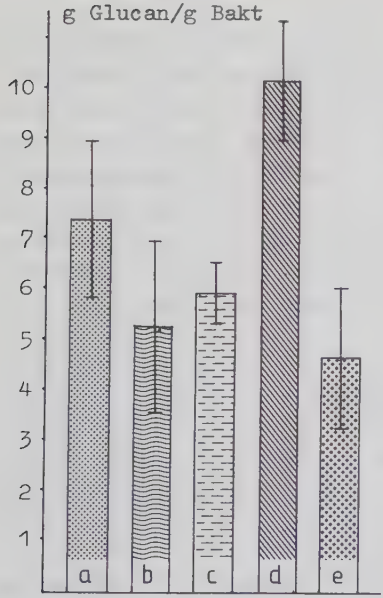

Abb. 4 g Gesamtglucan pro g Bakterienmasse bei den Stämmen der Typen a-e von S. mutans

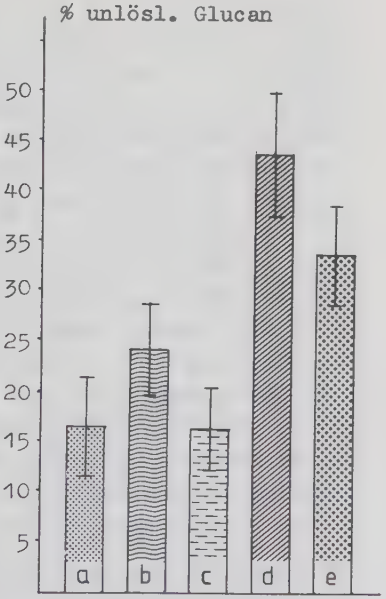

Abb. 5 % unlösl. Glucan vom Gesamtglucan bei den Stämmen der Typen a-e von S. mutans

Abb. 2-5 Mittelwert±Standardabweichung (nach Trautner et al.1981)

turen einiger S. mutans Stämme isoliert hatte. Neben unterschiedlichen Syntheseleistungen der aufbauenden Glucosyltransferase können auch antagonistische Wechselwirkungen zwischen aufbauender Glucosyltransferase und abbauender Glucanhydrolase das entgültig ausgebildete Glucan bestimmen. In diesem Zusammenhang untersuchten Felgenhauer und Trautner (1980) EPS, das Stämme der fünf Serotypen von S. mutans in saccharosehaltiger Nährlösung synthetisiert hatten. Sie fanden dabei, daß der Anteil des löslichen EPS ansteigt, wenn der Quotient Glucosyltransferase/ Glucanhydrolase größer wird. Dies unterstreicht die Bedeutung des Zusammenwirkens beider Enzyme für die Ausbildung des EPS.

Die Unterschiede in der Löslichkeit der Polysaccharide gehen auf chemische Strukturmerkmale zurück. Wurden wasserunlösliche extrazelluläre Polysaccharide von Stämmen des Typs d in vitro mit Dextranase behandelt, konnte nur eine unvollständige Auflösung erzielt werden. Es blieben wesentlich größere Mengen von Spaltprodukten mit mehr als zehn Glukoseresten zurück als bei entsprechenden Versuchen mit EPS von Stämmen des Typs c (Bramstedt 1976). Die Ursache liegt in der unterschiedlichen Verknüpfung der einzelnen Glukosebausteine. Glucan von Stämmen der Typen a und d weist eine größere Anzahl von α-1,3 Bindungen und mehr Verzweigungen auf als das Glucan von Stämmen der Typen b, c und e, das vorwiegend aus α-1,6 verknüpften Glukoseresten aufgebaut ist (Trautner et al. 1981b). Dies gilt vor allem für das Glucan der unlöslichen Fraktion, während bei der löslichen Fraktion nur geringe Unterschiede in den Bindungstypen bestehen (Trautner et al. 1981a).

Für die nach dem synthetisierten Polysaccharid aufgestellte Gruppierung gibt es weitere Bestätigung. Stämme der Typen a und d besitzen nach Perch et al. (1974) biochemische Charakteristika, die bei Stämmen der Typen b, c und e nicht auftreten. Serologische Reaktionen deuten in die selbe Richtung. Stämme der Serotypen a und d und in gerin-

gem Ausmaß auch solche der Serotypen b und c zeigen Kreuzreaktionen (Linzer et al. 1976; Jacono et al. 1975). Antigene des Polysaccharids von Stämmen der Typen a und d enthalten jeweils sowohl die typenspezifische antigene Determinante als auch eine beiden Typen gemeinsame antigene Determinante (Linzer et al. 1974 und 1975). Die typenspezifischen Antigene bei den Stämmen der Typen a und d werden aus Glukose und Galaktose, jene der Typen c und e aus Glukose und Rhamnose aufgebaut (Hamada und Slade 1976).

Es wäre sicherlich von größtem Interesse nachzuforschen, ob die gefundenen Unterschiede bei den extrazellulären Polysacchariden Parallelen in der Bedeutung der einzelnen Typen bei der Plaqueentwicklung und Kariesentstehung haben. Mutanten von S. mutans, die die Fähigkeit zur Bildung von klebrigem unlöslichem Glucan verloren hatten, verursachten im Tierversuch weniger Karies als die Ausgangsstämme (de Stoppelaar et al. 1971; Tanzer et al. 1974; Kishimoto et al. 1979). Huis in't Veld et al. (1979) weisen in ihrer Arbeit eine positive Korrelation zwischen aktiver Karies und dem Vorkommen von S. mutans in der gleichen Mundhöhle nach. Stämme vom Serotyp d treten dabei wesentlich häufiger zusammen mit aktiver Karies auf als die Stämme anderer Serotypen von S. mutans.

Die darauf zu gründende Annahme, daß die Kariogenität von Mikroorganismen mit zunehmender Produktion von unlöslichen Glucanen ansteigt, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen. Gegen den unbedingten Zusammenhang zwischen Bakterienstämmen, die unlösliches Glucan synthetisieren, und aktiver Karies spricht das vergleichsweise seltene Vorkommen von Stämmen des Serotyps d. In Europa, Japan und Amerika sind Stämme des Typs c am häufigsten. Etwas seltener werden Stämme der Typen d und e gefunden, während Stämme der Typen a und b meist nicht in Erscheinung treten (Hamada et al. 1980; Huis in't Veld et al. 1979). Für den Raum Würzburg fanden Gehring et al. (1976) eine Zusammensetzung aus 68 % Stämmen des Typs c, 19 % Stämmen des Typs

d und je 4 % Stämmen der Typen b und e. Sie stimmen damit im wesentlichen mit den anderen Untersuchungen überein.

Vorausgesetzt, in vitro gewonnene Ergebnisse lassen sich auf Verhältnisse in vivo übertragen, kann man folgendes feststellen. Neben der Fähigkeit zur Synthese von unlöslichem klebrigem Polysaccharid sind weitere Eigenschaften bei der Besiedelung der Zahnoberfläche von Bedeutung. Eine optimale Fähigkeit, sich wechselndem Sauerstoffangebot oder einem veränderten pH Milieu anzupassen, kann dabei eine ebenso wichtige Rolle spielen wie eine hohe Vermehrungsrate oder die Möglichkeit, durch Bildung von intra- und extrazellulären Reservekohlenhydraten Substratmangelzeiten leichter zu überstehen. Auch die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Keimen können die Entwicklung einer Population beeinflussen. Bei aller Bedeutung dieser Eigenschaften für die Durchsetzungsfähigkeit eines Bakterientyps bleibt doch die Synthese unlöslichen klebrigen Glucans ein wichtiges Element beim Plaqueaufbau und bei der Haftung der Bakterien untereinander und an der Zahnoberfläche. Die Stämme von S. mutans synthetisieren solches Glucan in unterschiedlicher Menge und Zusammensetzung. Wenn sich zwischen diesen Unterschieden und der Kariogenität des entsprechenden Stammes von S. mutans ein Zusammenhang herstellen läßt, bietet sich ein Ansatzpunkt für eine kausale Therapie. So ließe sich durch die Anwendung einer genau entsprechenden Enzymkombination die Synthese des maßgeblichen Polysaccharids unterbinden oder bereits gebildetes wieder auflösen. Unter Ausnutzung immunologischer Reaktionen könnten durch die Entwicklung und Anwendung geeigneter Impfstoffe die Stämme bestimmter Serotypen ausgeschaltet werden. Voraussetzung für einen Erfolg der Kariesbekämpfung bleibt jedoch in jedem Fall, daß sämtliche bekannten Prophylaxemaßnahmen konsequent angewendet werden, auch wenn jahrzehntealte Gewohnheiten dagegen stehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Synthese extrazellulärer Polysaccharide wurden je zehn Stämme der Typen b und e von S. mutans in Kulturflaschen mit saccharosehaltiger Nährlösung sieben Tage im Brutschrank gehalten. Die von den Bakterien synthetisierte Säure wurde täglich neutralisiert. Das gebildete Substrat wurde nach Ende der Anzucht durch Zentrifugation gewonnen und in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion aufgeteilt. Bei der Analyse wurden jeweils der EPS Gehalt, der Bakteriengehalt, der Glukose- und Fruktosegehalt der Fraktionen bestimmt.

Das von den Stämmen der Typen b und e synthetisierte EPS läßt in Menge und Zusammensetzung keine Unterschiede zwischen beiden Typen erkennen.

Unterschiede in Menge und Zusammensetzung des synthetisierten EPS ergibt jedoch der Vergleich mit Stämmen der Typen a, c und d von S. mutans. Die Stämme der Typen b und e synthetisierten mehr Fruktan als die übrigen Typen. Die Stämme des Typs d synthetisierten das meiste EPS pro Gramm Bakterienmasse und wiesen beim Gesamtglucan den höchsten Anteil unlöslichen Glucans auf. Das von den Stämmen der Typen b, c und e synthetisierte EPS stimmt seinerseits in Menge und Zusammensetzung weitgehend überein. Das EPS der Stämme vom Typ a nimmt eine Mittelstellung zwischen diesen beiden Gruppen ein. Andere biochemische und serologische Merkmale führen zu einer ähnlichen Zusammenstellung.

Mögliche Auswirkungen der Unterschiede in Menge und Löslichkeit des synthetisierten EPS auf Plaqueentstehung und Karies sowie Konsequenzen für die Kariesprophylaxe wurden diskutiert.

SCHRIFTTUM

Block, P. L., Dooley, C. L., Howe, E. E.: The retardation of spontaneous periodontal disease and the prevention of caries in Hamsters with dextranase
The Journal of Periodontology 40 (1969)

Bowen, W. H.: The effect of dextranase on caries activity in monkeys (Macaca irus)
Brit. dent. J. 131 445-449 (1971)

Bramstedt, F. and Trautner, K.: Isolation and analysis of extracellular polysaccharides from plaque streptococci
Caries Res. 5 27 (1971)

Bramstedt, F.: Untersuchungen extrazellulärer Polysaccharide
DFG, SFB 92 Bericht 1976, 179-195, Würzburg 1976

Bratthall, D.: Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling Str. mutans
Odont. Revy 21, 143-152 (1970)

Caldwell, R. C., Sandham, H. J., Mann, W. V., Finn, S. B., Formicola, A. J.: The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque in young adults and children
J. Amer. Dent. Assoc. 82, 124-131 (1971)

Ciardi, J. E., Beaman, A. J. and Wittenberger, C. L.: Purification, resolution, and interactions of the glucosyltransferases of Streptococcus mutans 6715
Infect. Immun. 18, 237-246 (1977)

de Stoppelaar, J. D., König, K. G., Plasschaert, A. J. M., and van der Hoeven, J. S.: Decreased cariogenicity of a mutant of Streptococcus mutans
Archs oral Biol. 16, 971-975 (1971)

Dewar, M., and Walker, G. J.: Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque. I. Dextranase activity of streptococci, and the extracellular polysaccharides synthesized from sucrose

Caries Res. 9, 21-35 (1975)

Duany, C. F., Zinner, D. D., Mena, J. C., Gonzalez, J. M.: The effect of dextranase on oral health in children J. of Preventive Dent. 2, No. 2, March-April (1975)

Felgenhauer, B.: Isolierung und Charakterisierung der extrazellulären Glukosyltransferase von Streptococcus mutans Stamm 227
Ph. D. thesis, Univers. Würzburg (1976)

Felgenhauer, B., and Trautner, K.: Purification and properties of an endodextranase of various strains of Streptococcus mutans
Caries Res. 14, 159 (1980)

Fitzgerald, R. J., Keyes, P. H., Stoudt, T. H., Spinell, D. M.: The effects of a dextranase preparation on plaque and caries in Hamsters, a preliminary report
J. Amer. Dent. Assoc. 76, 301-304 (1968)

Frank, R. M., Cahen, P. M., Forlot, P.: Etude de l'efficacité anticarieuse de diverses enzimes chez le rat
Jour. Biol. Buccale 1, 273-280 (1973)

Guggenheim, B.: Die Rolle mikrobieller Zahnbeläge in der Ätiologie von Zahnkaries und parodontalen Erkrankungen
Path. Mikrobiol. 40, 207-226 (1974)

Guggenheim, B., König, K. G., Mühlemann, H. R., Regolati, B.: Effect of dextranase on caries in Rats harbouring an indigenous cariogenic bakterial flora
Archs oral. Biol. 14, 555-558 (1969)

Guggenheim, B., and Newbrun, E.: Extracellular glucosyltransferase activity of an HS strain of Str. mutans
Helv. Odont. 13, 84-97 (1969)

Guggenheim, B., Regolati, B., and Mühlemann, H. R.: Caries and plaque inhibition by mutanase in rats
Caries Res. 6, 289-297 (1972)

Guggenheim, B., and Burckhardt, J. J.: Isolation and properties of a dextranase from Streptococcus mutans OMZ 176
Helv. odont. Acta 18, 101-113 (1974)

Guggenheim, B. und Regolati, B., Riethe, P. und Weller, H. K.: Dosis und kariostatische Wirkung von Mutanase im Rattenversuch
DZZ 30, 611-613 (1975)

Hamada, S., and Slade, H. D.: Purification and immunological characterization of type e polysaccharide antigen of Streptococcus mutans
Infect. Immun. 14, 68-76 (1976)

Hamada, S., Ooshima, T., Masuda, N., Mizuno, J., and Sobue, S.: Inhibition of Rat dental caries by dextranase from a strain of Spicaria violacea
Japan. J. Microbiol. 20(4), 321-330 (1976a)

Hamada, S., Ooshima, T., Masuda, N., Sobue, S.: Effect of dextranase prepared from Spicaria violacea on dental caries in the Hamster
J. of Dent. Res. 55(3), 552 (1976b)

Hamada, S., Masuda, N., Kotani, S.: Isolation and serotyping of Streptococcus mutans from teeth and feces of children
J. of Clin. Microbiol. April, 314-318 (1980)

Hotz, P., Guggenheim, B., and Schmid, R.: Carbohydrates in pooled dental plaque
Caries Res. 6, 103 (1972)

Huis in't Veld, J. H. J., van Palenstein Helderman, W. H., and Backer Dirks, O.: Streptococcus mutans and dental caries in humans: a bacteriological and immunological study
Antonie van Leeuwenhock 45, 25-33 (1979)

Jacono, V. J., Taubman, M. S., Smith, D. J., and Levine, M. J.: Isolation and immunochemical characterisation

of the group-specific antigen of Streptococcus mutans 6715
Infect. Immun. 11, 117-128 (1975)

Kelstrup, J., Funder-Nielsen, T. D., Møller, E. N.:
Enzymatic reduction of the colonization of Streptococcus mutans in human dental plaque
Acta Odont. Scand. 31, 249-253 (1973)

Kelstrup, J., Holm-Pedersen, P., and Poulsen, S.:
Reduction of the formation of dental plaque and gingivitis in humans by crude mutanase
Scand. J. Dent. Res. 86, 93-102 (1978)

Keyes, P. H., Hicks, M. A., Goldman, B. M., McCabe, R. M., Fitzgerald, R. J.: Dispersion of dextranous bacterial plaques on human teeth with dextranase
J. of Amer. Dent. Assoc. 82, 136-141 (1971)

Kishimoto, E., Koga, T., and Inoue, M.: Cariogenic virulence of Streptococcus mutans AHT mutants with altered in vitro adherence abilities in Hamsters
Microbiol. Immunol. 23, 849-857 (1979)

Klotzsch, H., Bergmeyer, H. U.: Enzymatische Bestimmung von Fruktose und Glukose in: Methoden der enzymatischen Analyse (Edited by Bergmeyer, H. U.)
Verlag Chemie, Weinheim, 99 u. 156 (1962)

Kuramitsu, H. K.: Characterization of extracellular glucosyltransferase activity of Streptococcus mutans
Infect. Immun. 12, 738-749 (1975)

Linzer, R., and Slade, H. D.: Purification and characterization of Streptococcus mutans group d cell wall polysaccharide antigen
Infect. Immun. 10, 361-368 (1974)

Linzer, R., Mukasa, H., and Slade, H. D.: Serological purification of polysaccharide antigens from Streptococcus mutans serotypes a and d: characterization of multiple antigenic determinants
Infect. Immun. 12, 791-798 (1975)

Linzer, R., Cill, K., and Slade, H. D.: Chemical composition of Streptococcus mutans type c antigen: comparison to type a, b, and d antigens
J. Dent. Res. 55, A 109-A 115 (1976)

Lobene, R. R.: A clinical study of the effect of dextranase on human dental plaque
J. Amer. Dent. Assoc. 82, 132-135 (1971)

Miller, W. D.: Die Mikroorganismen der Mundhöhle
Thieme, Leipzig (1889)

Murayama, Y., Wada, H., Hayashi, H., Uchida, T., Yokomizo, J., Hamada, S.: Effects of dextranase from Spicaria violaceae (IFO 6120) on the polysaccharides produced by oral Streptococci and on human dental plaque
J. of Dent. Res. 52, 658-667 (1973)

Nyman, S., Lindhe, J., and Janson, J-C.: The effect of a bacterial dextranase on human dental plaque formation and gingivitis development
Odont. Revy. 23, 243-252 (1972)

Perch, B., Kjems, E., and Ravn, T.: Biochemical and serological properties of Streptococcus mutans from various human and animal sources
Acta path. mikrobiol. scand. 82, 357-370 (1974)

Poulsen, S., Larson, R. H., and Senning, R. S.:
Effect of dextranase on plaque formation and caries development in the Rat
Scand. J. Dent. Res. 86, 231-236 (1978)

Pulkownik, A., and Walker, G. J.: Purification and substrate specificity of an endo-dextranase of Streptococcus mutans Kl-R
Carbohyd. Res. 54, 237-251 (1977)

Regolati, B., Guggenheim, B.: Effects of protease activity in crude mutanase on caries and plaque in rats
Helv. Odont. Acta. 18, 97 (1974)

Scott, T. A., and Melvin, E. H.: Determination of dextran with anthrone
Analyt. Chem. 25, 1656-1661 (1953)

Shklair, J. L., Keene, H. J.: A biochemical scheme for the separation of the five varieties of Streptococcus mutans
Archs. oral Biol. 19, 1079-1081 (1974)

Tanzer, J. M., Freedman, M. L., Fitzgerald, R. J., and Larson, R. H.: Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of Streptococcus mutans
Infect. Immun. 10, 197-203 (1974)

Trautner, K., Gehring, F., Lohmann, D.: Extracellular glucans synthesized by strains of two types of Streptococcus mutans in vitro
Archs. oral Biol. 23, 175-181 (1978)

Trautner, K., Felgenhauer, B., and Rieder, H.: Studies on extracellular polysaccharide synthesized by Streptococcus mutans of serotype a-e in vitro
Archs. oral Biol. (in press) (1981a)

Trautner, K., Birkhed, D., and Svensson, S.: Structure of extracellular glucans synthesized by Streptococcus mutans of serotypes a-e in vitro
Caries Research (in press) (1981b)

LEBENSLAUF

Am 18. Januar 1955 wurde ich als erstes Kind des Stadtoberamtsrats Willy Rieder und seiner Ehefrau Hermine Rieder, geb. Stößl, in Eichstätt geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Eichstätt, trat 1965 in das Willibaldgymnasium Eichstätt über und konnte am 22. Juni 1974 die Reifeprüfung erfolgreich ablegen.

Nach Ableistung eines Teils des Grundwehrdienstes von Juli 1974 bis April 1975 nahm ich zum Sommersemester 1975 an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg das Studium der Zahnheilkunde auf, legte im November 1977 die zahnärztliche Vorprüfung und im Juli 1980 die zahnärztliche Prüfung ab.

Am 7. August 1980 erhielt ich vom Bayerischen Staatsministerium des Inneren die Approbation als Zahnarzt.

Seit 1. Oktober 1980 bin ich an der Klinik für Zahn-,Mund- und Kieferkrankheiten der Universität Würzburg als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Poliklinik für Zahnersatzkunde tätig.

Würzburg, 24. Juni 1981

Hermann Rieder